

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Praha 2010

Kateřina Cmuntová

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

**STANOVENÍ As_2O_3 V HOMEOPATICKÝCH
PŘÍPRAVCÍCH ARSENICUM ALBUM METODOU
ATOMOVÉ ABSORPČNÍ SPEKTROMETRIE
S GENEROVÁNÍM HYDRIDŮ**

*Determination of As_2O_3 in homeopathic products Arsenicum Album
using atomic absorption spectrometry with hydride generation*

*Bakalářská práce
studijního oboru Chemie v přírodních vědách*

Praha 2010

Kateřina Cmuntová

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Mgr. Václava Červeného, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 27. května 2010

.....
podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mgr. Václavu Červenému, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas, poskytnutou pomoc, rady a připomínky.

Také děkuji své rodině za trpělivost a za celkovou podporu, kterou mi poskytovali po celou dobu studia.

Abstrakt:

Tato práce je zaměřena na stanovení obsahu As v různých typech homeopatika Arsenicum Album, které jsou k dispozici na českém trhu. Využita byla metoda atomové absorpční spektrometrie s chemickým generováním hydridů. V porovnání s maximální denní dávkou a s přihlédnutím k doporučené denní dávce léčiva bylo diskutováno, jestli pro lidský organismus v krajních případech nehrozí zdravotní rizika z nadměrného příjmu arsenu.

Klíčová slova:

Stanovení As, Arsenicum Album, atomová absorpční spektrometrie

Abstract:

This bachelor thesis is intent on As determination in various types of homeopathic remedy Arsenicum Album which are available in Czech Republic. The method selected for this determination is atomic absorption spectrometry with hydride generation. The content of As_2O_3 in recommended daily dose of homeopathic was confronted with toxicologically referred maximal dose and it was discussed if there is any risk of health damage by using Arsenicum Album.

Keywords:

As determination, Arsenicum Album, atomic absorption spectrometry

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	8
1 ÚVOD.....	10
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1 Atomová absorpční spektrometrie	11
2.1.1 Princip metody	11
2.1.2 Zdroje záření	11
2.1.3 Atomizace	12
2.1.4 Generování hydridů	13
2.2 Arsen	14
2.2.1 Charakteristika a výskyt	14
2.2.2 Použití	14
2.2.3 Sloučeniny	14
2.2.4 Toxicita.....	15
2.3 Homeopatie	17
2.3.1 Historie	17
2.3.2 Legislativa	17
2.3.3 Principy léčby	18
2.3.4 Příprava, potenciace, dynamizace	18
2.3.5 Arsenicum album	19
2.3.6 Vědecký výzkum	20
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1 Použité chemikálie.....	21
3.2 Použité přístroje.....	21
3.3 Pracovní postup generování hydridu pro stanovení As	21
3.4 Optimalizace metody	23
3.4.1 Průtok nosného plynu	24

3.4.2	Koncentrace HCl	25
3.4.3	Průtok reaktantů	27
3.4.4	Optimální podmínky měření	28
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	29
4.1	Kalibrační závislost	29
4.2	Mez stanovitelnosti, mez detekce, opakovatelnost	30
4.3	Stanovení As v homeopaticích	31
4.4	Diskuse	32
4.4.1	Přípravky vyšších potencií	32
4.4.2	Přípravek 3C	32
4.4.3	Výhled do budoucna	33
5	ZÁVĚR	34
	POUŽITÁ LITERATURA	35

Seznam použitých symbolů a zkratek

A	absorbance
A	ampér
AAS (<i>Atomic Absorption Spectrometry</i>)	atomová absorpční spektrometrie
c	molární koncentrace (mol/dm^3)
C	označení potence homeopatika
cm	centimetr
č.	číslo
ČLS JEP	Česká lékařská společnost J. E. Purkyně
ČR	Česká republika
D	označení potence homeopatika
DDD	doporučená denní dávka
dm^3	decimetr krychlový
EDL (<i>Electrodeless Discharge Lamp</i>)	bezelektrodová výbojka
ETA (<i>Electrothermal Atomization</i>)	elektrotermální atomizace
κ	atomový absorpční koeficient
FA (<i>Flame Atomization</i>)	plamenová atomizace
g	gram
HCL (<i>Hollow Cathode Lamp</i>)	výbojka s dutou katodou
CH	označení potence homeopatika
I_1	napájecí proud Superlampy (mA)
I_2	zesilovací proud Superlampy (mA)
k	směrnice kalibrační závislosti
K	kelvin
K	označení potence homeopatika
kg	kilogram
l	délka (m)
l	litr
LED (<i>Light-Emitting Diod</i>)	světlo emitující dioda
LM	označení potence homeopatika
LOEL (<i>Lowest-Observed-Effect-Level</i>)	nejnižší dávka s pozorovaným účinkem
M	1 mol/dm^3
m	hmotnost (kg)
m	metr

mA	miliampér
Me ⁰	atom kovu v základním stavu
mg	miligram
min	minuta
ml	mililitr
mol	jednotka látkového množství
M _r	relativní molekulová hmotnost
N	„negativní“, označení typu polovodiče
n	látkové množství (mol)
ng	nanogram
nm	nanometr
NOEL (<i>No-Observed-Effect-Level</i>)	nejvyšší dávka bez pozorovaného účinku
p.a. (<i>per analysis</i>)	označení čistoty chemikálie
pH	jednotka stupnice kyselosti
ppb (<i>parts per billion</i>)	(10 ⁻⁹) = 1 µg/kg = 1 ng/ml
ppm (<i>parts per million</i>)	(10 ⁻⁶) = 1 mg/kg = 1 µg/ml
ppt (<i>parts per trillion</i>)	(10 ⁻¹²)
Q	označení potence homeopatika
Q _{Ar}	objemový průtok nosného plynu (ml/min)
Q _R	objemový průtok reaktantů (ml/min)
RfD (<i>Reference Dose</i>)	referenční dávka
Sb.	sbírka (zákonů)
str.	stránka
t _{AT}	teplota atomizátoru (°C)
U	napětí (V)
USA (United States of America)	Spojené státy americké
V	objem (l)
V	volt
X	označení potence homeopatika
λ	vlnová délka (nm)
Δλ	šířka spektrálního intervalu
σ	směrodatná odchylka
°C	stupeň Celsia
µg	mikrogram

1 ÚVOD

Arsenicum Album podle homeopatů dokazuje paradox, že nejlepší léky vznikají z nejsilnějších jedů, což se tvrdilo už dávno před vznikem homeopatie. Paracelsus

i jiní jeho následníci věřili pravidlu „Ubi virus, ibi virtus“, to v překladu znamená „Kde je jed, je i ctnost (léčivá síla).“

Oxid arsenitý je všeobecně známý jako prudký jed. Přesto je tato látka používána jako homeopatické léčivo. Přípravek s názvem Arsenicum Album obsahuje oxid arsenitý ve velmi malém množství. Přesto jsou evidovány případy, kdy došlo po nesprávném používání tohoto homeopatika k příznakům otravy As.[1] S látkou, která je takto jedovatá, se nepochybně musí zacházet s příslušnou opatrností.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Atomová absorpční spektrometrie

2.1.1 Princip metody [2]

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) je důležitá analytická spektrometrická metoda pro stanovování koncentrací určitého prvku ve vzorku. Touto metodou je možno stanovit více než 60 (převážně kovových) prvků stopovou (koncentrace řádově v ppm) až ultrastopovou analýzou (koncentrace řádově v ppt). Vzorek je nejprve atomizován (nejčastěji v plameni, v kyvetě nebo křemenném atomizátoru při generování hydridů), vzniklé volné atomy jsou v základním stavu Me^0 . Atomizovaným vzorkem prochází monochromatické záření, pro daný prvek je charakteristická určitá vlnová délka, kterou absorbuje. Na detektor dopadá záření se sníženou intenzitou, protože část energie fotonů je spotřebována na excitaci atomů do vyššího energetického stavu.

Z údaje o úbytku intenzity záření lze zjistit koncentraci atomů daného prvku na základě Lambertova-Beerova zákona, z něhož plyne, že absorbance je úměrná koncentraci:

$$A = \kappa \cdot c \cdot l \quad (1)$$

kde A je absorbance, κ atomový absorpční koeficient, c koncentrace a l délka absorbujícího prostředí, která je pro daný atomizátor konstantní. Po vytvoření kalibrační závislosti absorbance na koncentraci lze určit směrnici k

$$A = k \cdot c \quad (2)$$

a z dané rovnice se snadno zjistí koncentrace analytu ve vzorku po změření A .

2.1.2 Zdroje záření [2, 3]

Důležitým faktorem používaného zdroje elektromagnetického záření je jeho časově stabilní hladina o vysoké intenzitě na spektrální čáře stanovovaného prvku. Velký odstup intenzity této čáry od spektrálního pozadí slouží k potlačení šumu a dosažení dobrého detekčního limitu.

Výbojka s dutou katodou (HCL)

Katoda vyrobená ze stanovovaného kovu má tvar dutého válce, výbojka emituje záření právě té vlnové délky, kterou daný kov absorbuje. Každý prvek má tedy pro stanovení vlastní výbojku. Anoda je vyrobena např. z wolframu, zirkonia nebo jiného kovu s vysokým bodem tání. Výbojka je naplněna vzácným plynem, jeho atomy se po vložení napětí ionizují a srážkami vyrážejí atomy kovu z katody.

Výbojka s vysokou zářivostí – Superlampa emituje záření vyšší intenzity a užší pološířky spektrální čáry. Linie signálu vykazuje nižší šum, klesá hodnota detekčního limitu.

Bezelektrodová výbojka (EDL)

Křemenná baňka naplněná inertním plynem (Ar) a přídavkem několika miligramů těkavé sloučeniny analytu je umístěna v cívce vysokofrekvenčního zdroje napětí. Technika je omezena použitím pro prvky snadno tvořící těkavé sloučeniny (například hydridy).

Kontinuálním zdrojem záření je například vysokotlaká deuteriová nebo xenonová výbojka, poskytuje záření o vysoké energii v širokém rozsahu spektra.

2.1.3 Atomizace [3, 5]

Tento proces může být proveden více způsoby, v principu jde vždy o získání volných atomů (Me^0) stanovovaného prvku. Při každé technice provedení je nutné zvolit takové podmínky, aby se atomy neionizovaly, ale maximální účinností se převedly na volné atomy v základním stavu.

Plamenová atomizace (FA)

Vzorek s analyzovaným prvkem je převeden do roztoku, poté zmlžčen (ultrazvukově nebo pneumatickým zmlžovačem) do formy aerosolu, který putuje přes homogenizátor (pro sjednocení velikosti kapiček aerosolu) do plamene. Zde je vzorek za vysoké teploty atomizován. Při použití plamene acetylen-vzduch lze dosáhnout teploty 2500 K, plamen směsi acetylen-oxid dusný dosahuje 3300 K. Je třeba zvolit vhodnou teplotu pro dosažení maximální populace neionizovaných atomů Me^0 . Nevýhodou FA je malá účinnost zmlžování.

Elektrotermická atomizace (ETA)

Vzorek je v malých množstvích (μl) nanášen na stěnu grafitové kyvety, která je následně vyhřívána průchodem elektrického proudu dle teplotního programu až na 3000°C . V inertní atmosféře nejprve vzorek projde fází sušení, ve fázi pyrolýzy dojde k odstranění matrice vzorku, následuje samotná atomizace a čištění kyvety. Oproti plamenové atomizaci se zvyšuje citlivost stanovení o několik řádů.

Atomizace hydridů

Plynný hydrid se atomizuje v křemenné trubici za teploty nad 900°C . Metoda generování těkavých hydridů ještě sníží práh citlivosti stanovení, ale nese s sebou omezení. Je použitelná pro malou skupinu prvků: As, Se, Sb, Sn, Bi, Te, Pb, Tl, Ge.

2.1.4 Generování hydridů [3, 5]

Chemické generování

Roztok tetrahydridoboritanu sodného NaBH_4 v kyselém prostředí a v přítomnosti hydridotvorného prvku vytváří v několika reakčních krocích hydrid tohoto prvku, který je těkavý a oddělí se od kapalné fáze.

Elektrochemické generování

V elektrolytické cele se analyt průchodem elektrického proudu na katodě redukuje na hydrid, čímž odpadá nutnost použití redukčního činidla (na rozdíl od generování chemického).

2.2 Arsen

2.2.1 Charakteristika a výskyt

Arsen (As, lat. *Arsenicum*) s atomovým číslem 33 se nachází v 5. A skupině a čtvrté periodě periodické soustavy prvků, řadí se mezi polokovy. Stabilní je pouze jeden izotop, relativní atomová hmotnost je proto určena s vysokou přesností 74,92. Elementární As je znám ve třech modifikacích: kovový (šedý, α -modifikace, romboedrická mřížka), žlutý As_4 (vzniklý sublimací plynného As, velice nestabilní) a ϵ -As (minerál arsenolamprit).[6]

Výskyt As v přírodě je významný ve formě sulfidů. Sulfidické rudy As jsou realgar As_4S_4 a auripigment As_2S_3 . Dále se vyskytuje například v minerálech arzenopyrit FeAsS , löllingit FeAs_2 , v malém množství v horninách, půdách a také v uhlí.[6]

Do ovzduší se dostává antropogenní činností, především spalováním fosilních paliv, užíváním pesticidů. Má tendenci se kumulovat v sedimentech a přetrvávat tak po dlouhou dobu ve vodách a půdách, dlouho setrvává i v potravním řetězci.[7]

2.2.2 Použití [6, 7]

As je používán do slitin s olovem a méně často s mědí. Prvek je z praktického hlediska důležitý pro elektroniku – pro výrobu polovodičů. Například arsenid galia GaAs a arsenid india InAs jsou látky s polovodičovými vlastnostmi používané pro výrobu tunelových a LED diod, infračervených zářičů, okének laserů. Čistý křemík dotovaný atomy As je polovodič typu N, který je součástí tranzistorů a počítačových procesorů. As ve sloučeninách se využívá na výrobu pesticidů, přípravků na konzervaci dřeva a ve sklářském průmyslu. As je obsažen v jedovaté bojové látce Lewisit.

2.2.3 Sloučeniny [6, 7]

Ve sloučeninách jsou pro As typická oxidační čísla -3, +3, +5. Téměř všechny sloučeniny jsou toxické, mnohem více ty s oxidačním číslem +3 a ve formě anorganické více než v organické. Výjimku tvoří sulfid arsenitý (pro svou malou rozpustnost) a čistý elementární As, u nichž nebyla zaznamenána toxicita.

Nejdůležitější sloučenina oxid arsenitý As_2O_3 (arsenik, otrušík) je bílý prášek proslulý svými toxickými vlastnostmi. Po požití dávky 0,2 g následuje smrt

v několika hodinách.[8] V plynné fázi tvoří oxid arsenitý molekuly As_4O_6 . Jeho rozpustnost ve vodě závisí na pH. V neutrálních a kyselých roztocích se vyskytuje velmi slabá kyselina trihydrogenarsenitá $\text{As}(\text{OH})_3$, která nebyla nikdy izolována. Oxid arsenitý ve vysoké čistotě má praktické použití v analytické chemii jako primární standard oxidimetrických titrací. Oxidem arsenitým jsou léčeny některé formy leukémie. Průmyslově se získává pražením sulfidických rud.

Arsenovodík (arsan) AsH_3 je prudce jedovatý bezbarvý plyn česnekového zápachu se silnými redukčními účinky. Vzniká působením atomárního vodíku a silných redukčních činidel (BH_4^-) na sloučeniny As. Oxiduje se snadno za vzniku vody a oxidu arsenitého. Arsan s kovy tvoří po zahřívání arsenidy.

2.2.4 Toxicita

As je svou toxicitou velmi nebezpečný pro člověka i životní prostředí, jedovaté jsou všechny látky, které tento prvek obsahují. Jsou potenciálními karcinogeny, mutageny a teratogeny, způsobují rakovinu plic a kůže, riziko vzniku nádoru je zvýšené i u dalších tkání a orgánů. Ve formě kovu není toxický, ale organismus z něj vytvoří jedovaté sloučeniny.[7, 8]

Pro podobnost fosforu ho může As nahrazovat v biochemických mechanismech a působí jako inhibitor biochemických reakcí. Reversibilně se váže na thiolové skupiny bílkovin.[7, 9, 10]

Otrava As se zkoumá měřením jeho koncentrace v moči, protože hlavně touto cestou je metabolicky vylučován.[9]

Inhalační expozice způsobuje podráždění plic, nosní sliznice a bolest v krku.

Akutní orální expozice As má škodlivý vliv na buňky nervového systému, jater, žaludku, střev a pokožky. Projevuje se bolestmi hlavy, závratěmi, prudkými bolestmi břicha, průjmem a zvracením.

Chronická orální expozice má typicky dermatotoxické účinky, způsobuje podráždění trávicího ústrojí, nervové soustavy a další zdravotní komplikace.

LOEL¹: 14 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$, NOEL²: 0,8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$, RfD³: 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$ [8, 10-12]

¹ LOEL je nejnižší dávka s pozorovaným účinkem na organismus

² NOEL je nejvyšší dávka bez pozorovaného účinku na organismus

³ Referenční dávka je odhad hodnoty pro dlouhodobě (celoživotně) přijatelný denní příjem látky bez zdravotních následků

Citlivost na As je hodně individuální, pravidelným užíváním lze několikanásobně zvýšit toleranci (opakovanou aplikací se snižuje vstřebávání) nebo dokonce vybudovat návyk. Byly pozorovány i abstinenční příznaky.[8]

Na území Bangladéše a Západního Bengálska (Indie) se obyvatelstvo potýká s kontaminací podzemních vod As, který se do vod dostává zvětráváním himálajského masivu, v němž je hojně zastoupen FeAsS.[13] Mezinárodní organizace zde před více než čtyřiceti lety zahájily rozsáhlý program proti mikrobiálním chorobám, které byly způsobeny používáním kontaminovaných povrchových vod. V Bangladéši se nechaly vyhloubit tisíce vrtů ke spodním vodám, aby se zamezilo parazitárním onemocněním. V roce 1994 byly oficiálně identifikovány první případy pacientů intoxikovaných As.[14] Humanitární opatření kontraproduktivně zavinila světově největší hromadnou otravu obyvatelstva kvůli vysokému obsahu As v podzemních vodách. Velký podíl populace je postižen chronickou expozicí. Postiženy jsou celkově miliony lidí ve dvaceti zemích, jen v Bangladéši a Západním Bengálsku je ohroženo přes 100 miliónů lidí.[15]

Navzdory své vysoké toxicitě má As pravděpodobně pro organismus určitý význam a řadí se mezi stopové prvky. Nachází se ve všech tkáních, nejvíc v kůži, vlasech a nehtech. Denní potřeba As není přesně zjištěná, odvozením z dat určených u živočichů činí pro člověka asi 12 – 25 µg, přičemž průměrná denní spotřeba se pohybuje kolem 12 – 60 µg.[9] Běžná strava bohatě pokrývá denní potřebu, největší koncentrace As je v rybách a mořských plodech. Maximální denní dávka As bez zdravotních důsledků je 0,3 µg/kg tělesné váhy. Přípustná hodnota As naměřená ve vlasech se uvádí 0,5 ppm. Letální dávka je 1 – 4 mg/kg tělesné hmotnosti (přibližně 70 – 300 mg).[9, 16]

2.3 Homeopatie

2.3.1 Historie

Některé základní principy homeopatie jsou známy již od starověku. Hippokrates vyslovil zákon podobnosti „*Similia similibus curantur*“ (podobné se léčí podobným), který je jedním z pilířů této alternativní léčebné metody. Slovo pochází z řeckých *homoios* – podobný a *pathos* – nemoc. Homeopatii jako moderní medicínský směr založil německý lékař Samuel Hahnemann (1755 – 1843). Po vystudování medicíny nebyl spokojen se způsoby tehdejšího léčení a začal se zabývat experimenty, které vyústily v základy moderní homeopatie. Pozoroval na sobě, že když užíval chinin, lék proti malárii, projevovaly se u něj podobné příznaky jako u pacientů s malárií. Provedl rozsáhlé empirické studie aplikací homeopatik (Prüfungen), při kterých sledoval účinky různých látek na zdravých jedincích.[17, 18]

2.3.2 Legislativa [19]

Homeopatie je jednou z nejrozšířenějších alternativních větví medicíny. Postavení homeopatie z právního hlediska se v každém státě liší. Některé země ji uznávají jako oficiální léčebnou metodu a hojně využívají. Ve Francii, Itálii nebo Španělsku smí homeopatii praktikovat jen lékaři, V Německu, Velké Británii, USA či Kanadě mohou homeopatika předepisovat lidé se speciální kvalifikací.

Legislativa v zemích Evropské unie vychází z jejich jednotných směrnic a stále se vyvíjí. Homeopatie byla prohlášena v České republice za léčebnou metodu v roce 1991, Českomoravská homeopatická společnost byla přijata do České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně (ČLS JEP). V české legislativě jsou homeopatické přípravky právně definovány jako lék od roku 1998, nyní jsou charakterizovány v novém zákoně o léčivech (č. 378/2007 Sb.).[20] Pod dohledem Státního ústavu pro kontrolu léčiv jsou zapsány tzv. zjednodušeným způsobem registrace – je posuzována kvalita a bezpečnost, ale v příbalových letácích je uvedena věta: *U přípravku nebyl požadován důkaz účinnosti*. Na obalu ze zákona nesmí být uvedena indikace ani způsob užití.

2.3.3 Principy léčby [21]

Homeopatická léčba se řídí několika pravidly:

- platí *zákon podobnosti* – léčba podobného podobným
- účinek homeopatika je testován na zdravém jedinci, pokud se u něj po podání projevují určité příznaky, právě nemoc s těmito příznaky je daným homeopatikem léčena, lék je užíván v nízkých koncentracích
- léčivo je zvoleno podle příznaků onemocnění, volí se zcela individuálně podle komplexního souboru příznaků a celkového zdravotního stavu jedince
- podmínkou je podávání velmi malých dávek (až infinitezimální zředění), je zavedena speciální stupnice a systém označení pro zředění účinné látky, neboli potenciace (viz tab. 2.1)
- účinek se zvyšuje dynamizací – pravidelným prudkým protřepáváním během potenciace

2.3.4 Příprava, potenciace, dynamizace [18, 21, 22]

Příprava podléhá přísným pravidlům a kvalita je kontrolována odpovědnými státními orgány stejně jako u jiných léčiv. Homeopatika se vyrábějí monokomponentní (259 přípravků registrovaných v ČR) nebo polykomponentní (10 registrovaných přípravků v ČR). Polykomponenty obsahují směsi více účinných látek v různých potencích, většinou se vyrábí ve formě tablet, kapek nebo sirupů a jsou používány pro typické druhy příznaků.

Základní účinná látka monokomponentu může být rostlinného, živočišného, syntetického či minerálního původu. Léčivo je pojmenováno zpravidla latinským názvem této látky. Nejprve se připraví matečná tinktura obsahující účinnou látku.

Následuje potenciace – při decimálním ředění dle Hahnemanna se jeden díl tinktury smíchá s devíti objemovými díly rozpouštědla, při centezimálním ředění jeden díl s devadesáti devíti. Rozpouštědlem je voda nebo ethanol, u nerozpustných substancí se použije laktóza. Vzniklá potence je označena 1D neboli 1X (resp. 1C neboli 1CH u centezimálního ředění). Speciální označení má potence 1LM neboli 1Q při ředění v poměru 1:50 000. Označení potence 1K se používá pro tzv. ředění podle Korsakova, které je centezimální, tedy v poměru 1:100, ale na rozdíl od předchozího probíhá celý proces ředění v jediné nádobě (vždy se z nádoby odsaje 99 % roztoku a pokračuje se v ředění).

Dynamizace probíhá v každé fázi naředění, jedná se o prudké protřepání směsi, které má homeopatiku dodat účinnost. Mechanismus nebyl vědecky ověřen ani vysvětlen.

Poslední fází je impregnace výsledného roztoku na neutrální nosič, většinou se jedná o granule či tablety ze směsi sacharózy a laktózy určené k perorálnímu užití.

Tab. 2.1 *Přehled označení potencí homeopatik, příklad výsledné koncentrace*

Označení potence	ředění	
1D = 1X	1:10	
5D = 5X	1:10 ředěno pětkrát	→ 1:100 000
1C = 1CH	1:100	
200C = 200CH	1:100 ředěno dvěstěkrát	→ 1:10 ⁴⁰⁰
1M = 1000C	1:10 ²⁰⁰⁰	
1LM = 1Q	1:50 000	
1K	1:100 → <i>provedení v jedné nádobě</i>	

Léčivo s vyšší potencí má mít lepší účinnost pro léčbu chronických příznaků. Nižší potence, tedy s vyšší koncentrací účinné látky, se používají, pokud jde pouze o místní podobnost příznaků pacienta a příznaků, které způsobuje léčivo.[15]

2.3.5 Arsenicum album

(jiné názvy: Arsenii trioxidum, Arsenii anhydridum, Metallum album)

Tento přípravek patří ve světě mezi 15 nejdůležitějších homeopatických léčiv. V České republice je volně prodejný od firmy Boiron v ředěních 5CH, 9CH, 15CH a 30CH. Ředění 200CH je pouze na lékařský předpis. Firma Peithner dodává přípravek v centezimálních potencích C: 3, 4, 5, 9, 12, 15, 30, 1000 a v decimálních D: 6, 10, 12, 30, 200, 1000.

Arsenicum Album je doporučováno obecně pro bolesti pálivého typu, které se zlepšují působením tepla, naopak zhoršují chladem. Podává se při trávicích obtížích – otrava jídlem, pálivý načernalý průjem se zvracením. Také se aplikuje na rýmu s pálivým a dráždivým výtokem z nosu, který se teplem zlepšuje. Má pomáhat proti kožním akutním pálivým infekcím. Je předepisován proti stresu, depresi, nespavosti nebo malárii.[11, 23, 24]

Homeopatika Arsenicum Album se zkoušelo užívat k léčbě otravy As, především v asijských zemích (Bangladéš, Indie), které byly postiženy zamořením zásob podzemní vody.[15]

2.3.6 Vědecký výzkum

Cesta k přesvědčivým výsledkům o účinnosti homeopatik je kvůli některým faktorům komplikovaná. Není možné provádět klinické studie s patřičnou kontrolou, jako dvojitě slepé s referenční skupinou⁴. Homeopatické léčivo se totiž předepisuje každému pacientovi zcela individuálně, dle jeho souboru příznaků a zdravotního stavu.[17]

Častým argumentem odpůrců homeopatie je účinnost léčiva vlivem placebo efektu. Vzhledem k tomu, že mechanismus účinku ještě nebyl vysvětlen, bude spor mezi příznivci homeopatie a jejich oponenty trvat pravděpodobně ještě dlouho.

Za dvě stě let existence homeopatie bylo provedeno mnoho výzkumů, výsledky byly značně rozporuplné. Pokud některé studie potvrzovaly účinek homeopatických léčiv, velmi často u nich byly nalezeny hrubé chyby v postupu, příliš malá zkoumaná skupina a její nenáhodný výběr, zamlčované skutečnosti, nepřítomnost kontrolních skupin, a pozitivních výsledků nebylo při opakování postupu dosaženo podruhé.[21]

V posledních letech byly provedeny kvalitní dvojitě slepé a kontrolované studie, které potvrdily vyšší účinnost homeopatik oproti placebo při následujících onemocněních: senná rýma, revmatoidní artritida, fibromyalgie, alergické astma, příznaky chřipky, dětský průjem.[21]

⁴ Dvojitě slepá studie: ani pacienti, ani lékaři neví, jaké skupině pacientů jsou podávány tablety s účinnou látkou a jaké skupině placebo. Referenční skupina pacientů slouží ke kontrole a neužívá žádné tablety.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Po celou dobu byla používána deionizovaná voda produkovaná přístrojem Mili Q_{PLUS}, Milipore, USA.

Pro přípravu roztoku 1% NaBH₄ v 0,4% NaOH byly použity
NaBH₄: M_r = 37,83, čistota „zur Synthese“, Merck, Německo
NaOH: M_r = 39,99, čistota p.a., Lachema, ČR.

Pro přípravu standardních roztoků As byl použit
As₂O₃: M_r = 197,84, čistota >99,5%, Fluka Chemikal, Švýcarsko.

Pro přípravu standardů a roztoků vzorku byl použit zásobní roztok
0,1 M kyseliny chlorovodíkové připravený z
HCl: 37%, čistota p.a., Merck, Německo.

Jako inertní nosný plyn byl používán Ar (> 99,99 %)

3.2 Použité přístroje

Měření byla prováděna na atomovém absorpčním spektrometru SpectrAA 300, Varian, Austrálie.

Jako zdroj záření použita byla použita As - Superlampa, Photron, Austrálie.

Byla používána peristaltická pumpa MasterFlex, Cole Parmer, USA.

Křemenný atomizátor byl externě vyhříván zařízením EHA 10, RMI, ČR

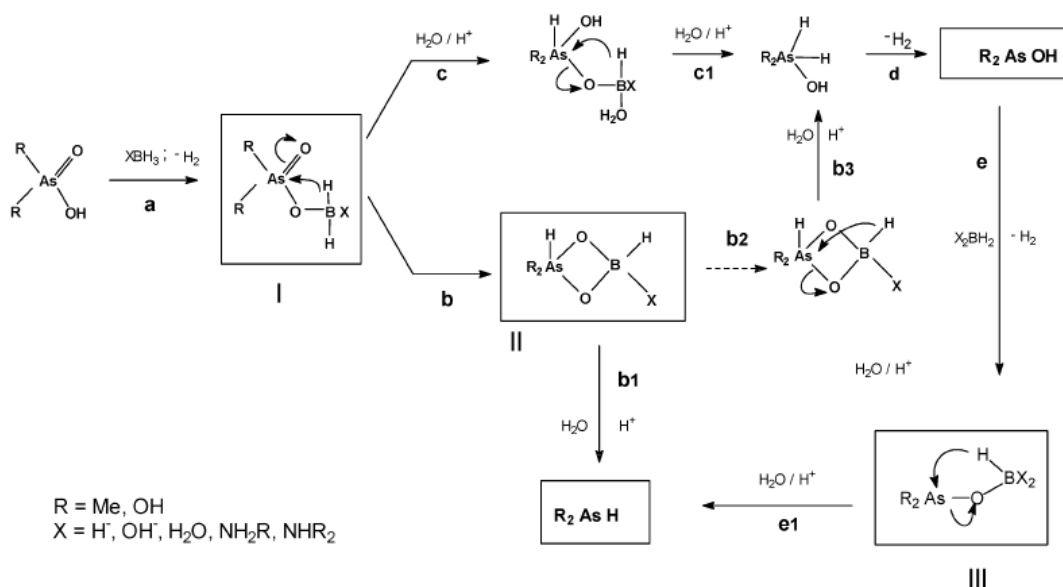
3.3 Pracovní postup generování hydridu pro stanovení As

Pro chemické generování arsanu byl připraven roztok 1% NaBH₄ v 0,4% NaOH.[5] Ještě donedávna bylo předpokládáno, že reakcí HCl s NaBH₄ vzniká atomární (nascentní) vodík vykazující silné redukční účinky. H[•] reaguje

s přítomným As_2O_3 za vzniku plynného arsanu AsH_3 . Schéma probíhajících reakcí dle této teorie tvorby hydridu je následující:



Nejnovější výzkumy[25] však vypovídají o jiném mechanismu, během něhož by se měly jako meziprodukty tvořit boranové komplexy. Byly nalezeny minimálně tři různé cesty pro vznik hydridu. Na Obr. 3.1 jsou naznačeny možné průběhy reakce, která je zahájena tvorbou komplexního intermediátu analyt-boran a vede ke konečnému produktu vícero dílčími reakcemi přesmyků, hydrolýzy a přenosů vodíku.



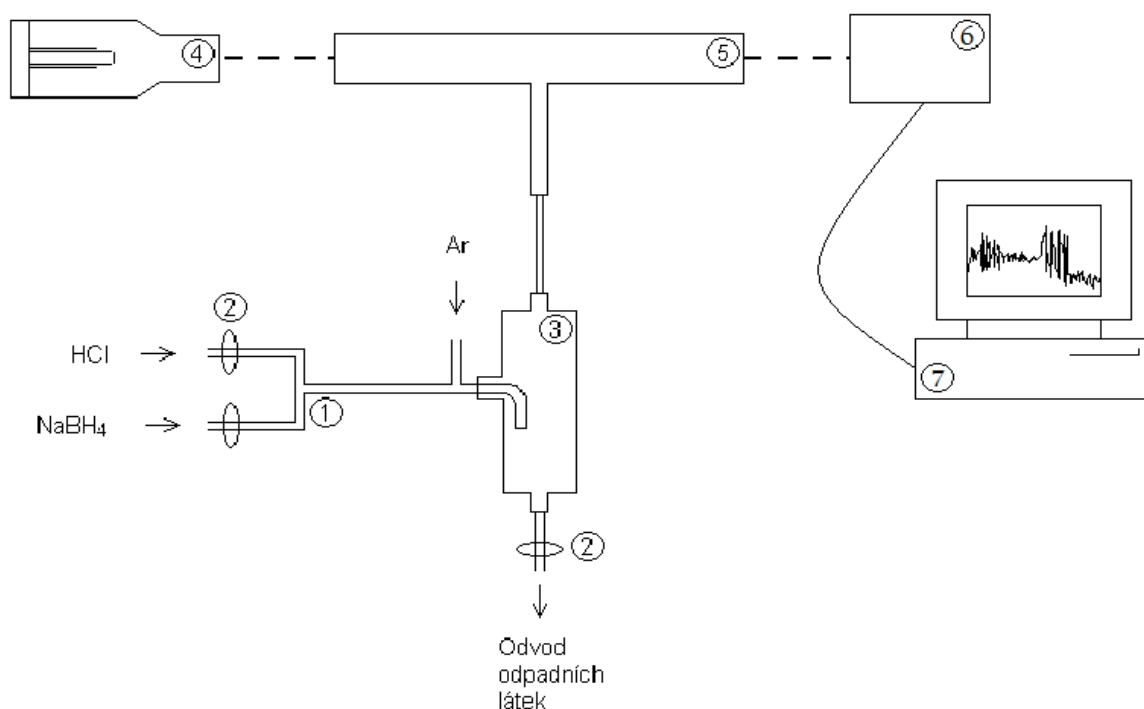
Obr. 3.1 Reakční schéma $\text{R}_2\text{AsO}(\text{OH})$ a R_2AsOH ($\text{R} = \text{OH}$, alkyl)s boranovými komplexy. Sloučeniny I, II, III byly identifikovány v kapalně a plynné fázi[25]

Pro měření na atomovém absorpčním spektrometru byla sestavena jednoduchá aparatura zobrazená schematicky na Obr. 3.2. Bylo pracováno v kontinuálním průtokovém režimu.

Ze zásobních nádob byly čerpány roztok NaBH_4 a roztok analytu v HCl (resp. samotný roztok HCl jako blank). Jejich reakcí během průtoku reakční cívkou se tvořil plynný AsH_3 , který se ve skleněném separátoru fází s nuceným odtahem oddělil od kapalně fáze a pokračoval s inertním plynem (Ar) do atomizátoru, Ar se

reakce neúčastnil a sloužil pouze jako nosný plyn. V atomizátoru dochází snadno k rozkladu nestálého hydridu a atomizaci As.

Atomizovaným vzorkem procházelo záření emitované výbojkou a dopadalo na detektor, který vyhodnotil úbytek intenzity. Na monitoru byl zobrazován časový průběh absorpance vzorku.



Obr. 3.2 Schéma aparatury

1 – Tygonové čerpací hadičky, teflonová reakční cívka a spojovací vedení;
2 – peristaltická pumpa; 3 – skleněný separátor fází s nuceným odtahem;

Atomový absorpční spektrometr: 4 – As - Superlampa; 5 – křemenný atomizátor;
6 – detektor; 7 – počítač, zpracování signálu

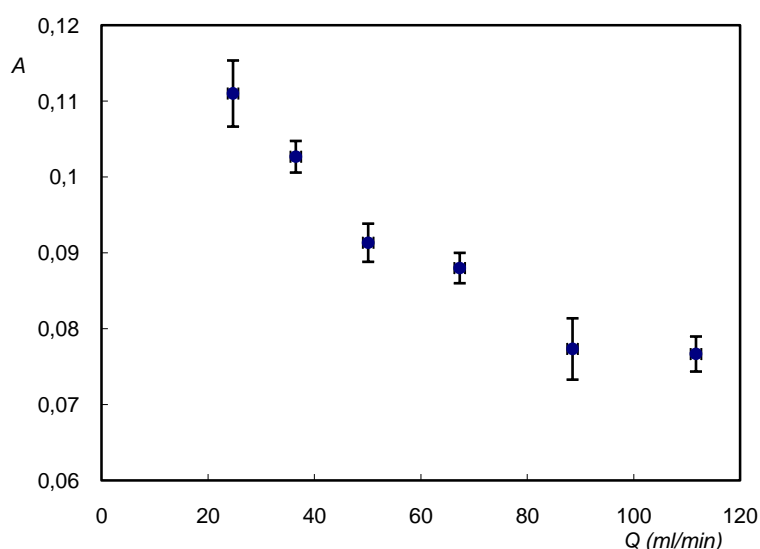
3.4 Optimalizace metody

Experimentální část byla zahájena hledáním optimálních podmínek pro stanovení As. Vždy byla sledována závislost absorpance A a velikosti šumu na měnících se experimentálních podmínkách. Jako vzorek byl používán standardní roztok As o koncentraci 150 ppb.

Porovnáním různých zapojení bylo zjištěno, že přívod nosného plynu připojený těsně před separátor fází poskytuje mnohem menší šum, než když byl plyn přiváděn do místa spojení reaktantů.

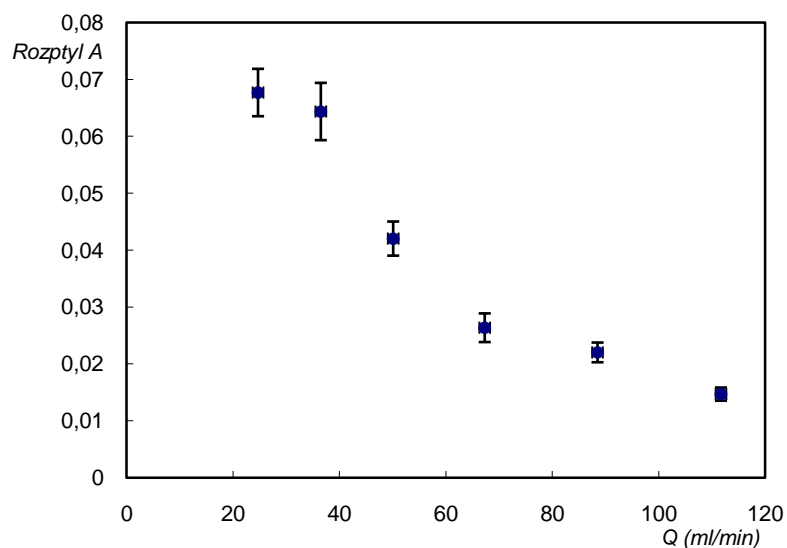
3.4.1 Průtok nosného plynu

Byla sledována závislost na rychlosti průtoku nosného plynu Q_{Ar} . Se stoupajícím průtokem Ar klesala A a zároveň klesala velikost šumu, jak je patrné z Obr. 3.3 a 3.4. Při malých průtokových rychlostech nosného plynu setrvává atomizovaný analyt v optické ose atomového absorpčního spektrometru delší dobu. Tvorba plynné fáze při chemickém generování hydridů je však značně nerovnoměrná a z tohoto důvodu je linie signálu velmi nestabilní. Vyšším průtokem Ar je možné šum linie signálu snížit. Optimální hodnota bývá volena jako kompromis mezi citlivostí stanovení a velikostí šumu. Jako optimální byla zvolena hodnota průtoku 67,3 ml/min a s touto hodnotou se dále pracovalo při následujících měřeních.



Obr. 3.3 Vliv průtoku nosného plynu na hodnotu absorbance

Podmínky měření vzorku As o koncentraci 150 ppb: $t_{AT} = 950\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I_1 = 15\text{ mA}$, $I_2 = 12\text{ mA}$, $U \approx 420\text{ V}$, $\lambda = 193,7\text{ nm}$, $\Delta\lambda = 0,5\text{ nm}$, $c_{HCl} = 1\text{ M}$, $Q_R = 2,7\text{ ml/min}$

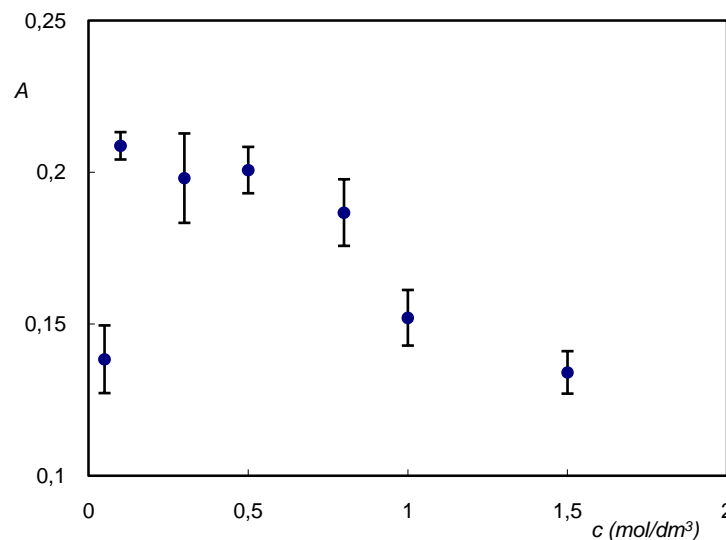


Obr. 3.4 Vliv průtoku nosného plynu na šum

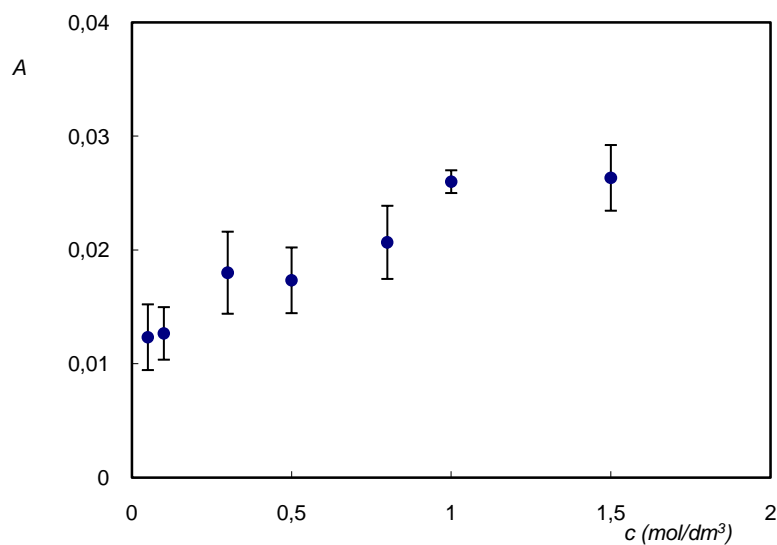
Podmínky měření vzorku As o koncentraci 150 ppb: $t_{AT} = 950\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I_1 = 15\text{ mA}$, $I_2 = 12\text{ mA}$, $U \approx 420\text{ V}$, $\lambda = 193,7\text{ nm}$, $\Delta\lambda = 0,5\text{ nm}$, $c_{HCl} = 1\text{ M}$, $Q_R = 2,7\text{ ml/min}$

3.4.2 Koncentrace HCl

Byly připraveny zásobní roztoky HCl o koncentracích 0,05 M, 0,1 M, 0,3 M, 0,5 M, 0,8 M, 1,0 M, 1,5 M a také standardní roztoky As o koncentraci 30 ppb ve všech zmíněných zásobních roztocích HCl. (Při měření signálu As v roztoku HCl určité koncentrace byl vždy použit jako blank zásobní roztok kyseliny téže koncentrace). Z Obr. 3.5 je zřejmé, že A dosahuje maxima u 0,1 M HCl. Šum linie signálu se stoupající koncentrací roste (Obr. 3.6). Optimální proto bylo použití 0,1 M HCl.



Obr. 3.5 Vliv koncentrace HCl v roztoku vzorku na hodnotu absorbance
 Podmínky měření vzorku As o koncentraci 150 ppb: $t_{AT} = 950 \text{ } ^\circ C$, $I_1 = 15 \text{ mA}$,
 $I_2 = 12 \text{ mA}$, $U \approx 420 \text{ V}$, $\lambda = 193,7 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 0,5 \text{ nm}$,
 $Q_R = 2,7 \text{ ml/min}$, $Q_{Ar} = 67,3 \text{ ml/min}$

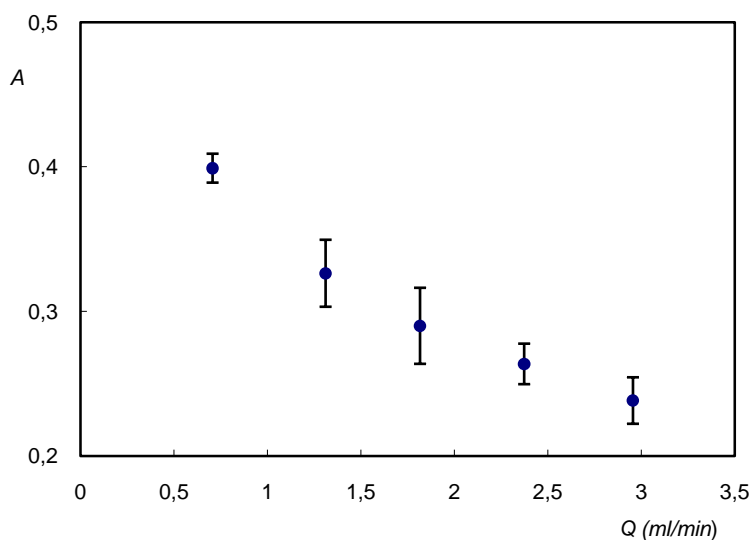


Obr. 3.6 Vliv koncentrace HCl v roztoku vzorku na šum
 Podmínky měření vzorku As o koncentraci 150 ppb: $t_{AT} = 950 \text{ } ^\circ C$, $I_1 = 15 \text{ mA}$,
 $I_2 = 12 \text{ mA}$, $U \approx 420 \text{ V}$, $\lambda = 193,7 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 0,5 \text{ nm}$,
 $Q_R = 2,7 \text{ ml/min}$, $Q_{Ar} = 67,3 \text{ ml/min}$

3.4.3 Průtok reaktantů

Celkový průtok roztoků reaktantů Q_R byl změřen jako součet objemových průtoků NaBH_4 a HCl . Přitom poměr průtoku NaBH_4 a HCl byl roven 1 : 4.

Při změnách rychlosti Q_R zůstal šum po celou dobu neměnný, zatímco A s rostoucím průtokem klesala, jak je patrné z Obr. 3.7. Jako optimální byla nadále považována nejnižší průtoková rychlost 0,7 ml/min, omezená možností nastavení peristaltické pumpy.



Obr. 3.7 Vliv průtoku reaktantů na hodnotu absorbance

Podmínky měření vzorku As o koncentraci 150 ppb: $t_{AT} = 950\text{ }^\circ\text{C}$, $I_1 = 15\text{ mA}$,

$I_2 = 12\text{ mA}$ $U \approx 420\text{ V}$, $\lambda = 193,7\text{ nm}$, $\Delta\lambda = 0,5\text{ nm}$,

$Q_{Ar} = 67,3\text{ ml/min}$, $c_{\text{HCl}} = 0,1\text{ M}$

3.4.4 Optimální podmínky měření

Uvedené optimalizační závislosti sloužily k nalezení vhodných podmínek měření. Tab. 3.1 shrnuje údaje o experimentálních podmínkách, za kterých bylo prováděno měření kalibrační závislosti a stanovení koncentrace As ve vzorcích.

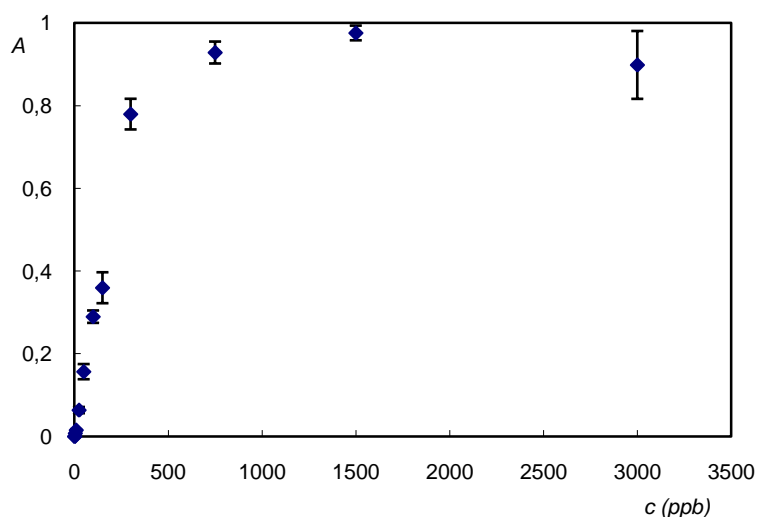
Tab 3.1 *Experimentální podmínky měření*

Teplota atomizátoru	$t_{AT} = 950\text{ }^{\circ}\text{C}$
Napájecí proud Superlampy	$I_1 = 15\text{ mA}$
Zesilující proud Superlampy	$I_2 = 12\text{ mA}$
Vlnová délka emitovaného záření	$\lambda = 193,7\text{ nm}$
Šířka spektrálního intervalu	$\Delta\lambda = 0,5\text{ nm}$
Napětí na fotonásobiči	$U \approx 420\text{ V}$
Průtok nosného plynu (Ar)	$Q_{Ar} = 67\text{ ml/min}$
Koncentrace HCl	$c = 0,1\text{ mol/dm}^3$
Průtok reaktantů	$Q_R = 0,7\text{ ml/min}$

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

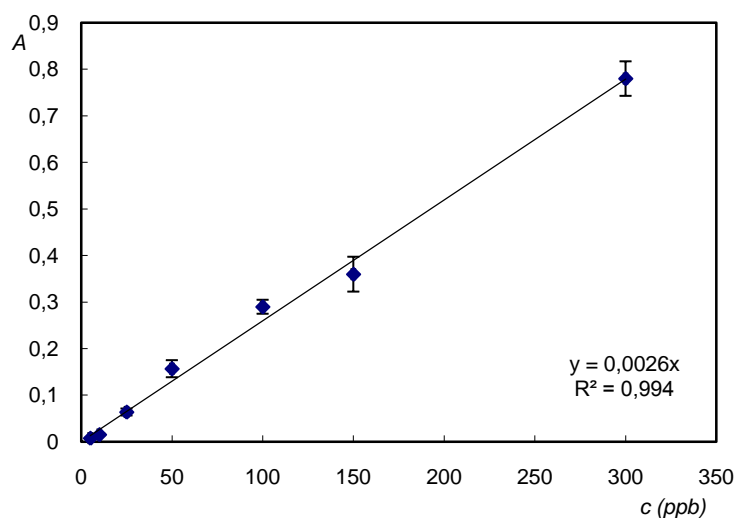
4.1 Kalibrační závislost

Pro sestavení kalibrační závislosti byly připraveny standardní roztoky v 0,1 M HCl o koncentracích As: 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 300, 750, 1500 a 3000 ppb. Za optimálních podmínek se sledovala závislost A na koncentraci analytu, která je vynesena v grafu na Obr. 4.1. Lineární byla tato závislost do 300 ppb. Tato část je znázorněna na Obr. 4.2.



Obr. 4.1 Kalibrační závislost

*Podmínky kalibračního měření: $t_{AT} = 950\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I = 15\text{ mA}$, $U \approx 420\text{ V}$,
 $\lambda = 193,7\text{ nm}$, $\Delta\lambda = 0,5\text{ nm}$, $Q_{Ar} = 67,3\text{ ml/min}$, $Q_R = 0,7\text{ ml/min}$, $c_{HCl} = 0,1\text{ M}$*



Obr. 4.2 Lineární oblast kalibrační závislosti

Podmínky kalibračního měření: $t_{AT} = 950\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I = 15\text{ mA}$, $U \approx 420\text{ V}$,
 $\lambda = 193,7\text{ nm}$, $\Delta\lambda = 0,5\text{ nm}$, $Q_{Ar} = 67,3\text{ ml/min}$, $Q_R = 0,7\text{ ml/min}$, $c_{HCl} = 0,1\text{ M}$

4.2 Mez stanovitelnosti, mez detekce, opakovatelnost

Pro určení meze detekce a stanovitelnosti bylo desetkrát opakováno měření absorbance standardního roztoku o koncentraci 10 ppb. Z naměřeného signálu byla vždy vypočítána koncentrace a poté její směrodatná odchylka σ . Mez detekce je určena hodnotou 3σ a mez stanovitelnosti 10σ .

Opakovatelnost výsledku byla stanovena na základě měření standardního roztoku o koncentraci 50 ppb, vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka absorbance v procentech.

Tab. 4.1 Zhodnocení metody HG-AAS pro stanovení arsenu

Mez detekce (ppb)	1,2
Mez stanovitelnosti (ppb)	4,2
Opakovatelnost (%)	10,7

4.3 Stanovení As v homeopaticích

3 g globulí analyzovaného přípravku (globule se rozpouštěly za laboratorní teploty) byly rozpuštěny v 0,1 M HCl do celkového objemu 10 ml. U každého vzorku byla při optimálních podmínkách (viz Tab. 3.1, str. 28) třikrát změřena absorbance a byla zjištěna průměrná hodnota. Z regresní rovnice kalibrační závislosti byla vypočítána koncentrace As. Hodnota byla přepočítána na obsah As_2O_3 v množství homeopatika odpovídajícím denní dávce a následně porovnána s toxikologickými údaji.

Tab. 4.2 ukazuje přehled přípravků, které byly analyzovány. Uvedená denní dávka se řídí doporučením výrobce.

Tab. 4.2 Seznam analyzovaných homeopatických přípravků

Název přípravku	Výrobce	Průměrná	
		Denní dávka (počet globulí)	hmotnost globule (g)
Arsenicum Album 5CH	Boiron	15	0,05
Arsenicum Album 9CH	Boiron	15	0,05
Arsenicum Album 3C	Peithner	30	0,008
Arsenicum Album 5C	Peithner	30	0,008
Arsenicum Album 6D	Peithner	30	0,008
Arsenicum Album 9C	Peithner	30	0,008
Arsenicum Album 10D	Peithner	30	0,008
Arsenicum Album 12D	Peithner	30	0,008
Arsenicum Album 15C	Peithner	30	0,008
Arsenicum Album 30D	Peithner	30	0,008

4.4 Diskuse

4.4.1 Přípravky vyšších potencií

Výsledné zředění matečného roztoku u jednotlivých přípravků naznačuje, že účinná látka se zde bude vyskytovat ve stopových až ultrastopových koncentracích, pokud se jedná o nižší potence. Ve vyšších potencích by se účinná látka neměla vyskytovat vůbec.

V homeopatii se používá pojmu Avogadrův limit. Je to určitá hranice zředění (dle prostého matematického výpočtu z Avogadrovy konstanty), nad kterou je pravděpodobnost výskytu jediné molekuly účinné látky nulová. Tato hranice se týká vyšších ředění počínaje potencí 12C (neboli 12CH, 24D).

U měření přípravků potencií 15C a 30D byl splněn předpoklad nulové koncentrace analytu a nebyl zaznamenán žádný signál.

Nulovou absorbanci vykazovaly i přípravky potencií 12D, 9C a 9CH, které se také svým zředěním blíží limitu Avogadrova čísla a koncentrace As je pravděpodobně hluboko pod limitem detekce.

U přípravků potence 5C, 5CH, 10D a 6D byla zaznamenána velmi slabá odezva, která však nepřesáhla úroveň odpovídající mezi detekce. Dá se předpokládat, že koncentrace nebudou limitu detekce příliš vzdálené a mohly by dosahovat cca desetin ppb.

4.4.2 Přípravek 3C

Přípravek s potencí 3C vykazoval jako jediný absorbanci, která přesáhla hodnoty odpovídající mezi detekce i mezi stanovitelnosti. Toto zjištění odpovídá faktu, že se jedná o nejnižší potenci, tudíž homeopatikum s největší koncentrací účinné látky. Zjištěná koncentrace As byla přepočítána na množství As_2O_3 přijaté v denní dávce homeopatika (dle doporučení výrobce) - 30 globulí obsahuje přibližně 5 ng As_2O_3 .

Teoreticky by přípravek 6D měl mít koncentraci As stejnou, to se však analýzou neprokázalo. K objasnění by možná přispěl výrobní postup použitý právě u těchto přípravků, který ale není k dispozici.

U přípravku 3C bylo navíc provedeno srovnávací měření (viz Tab. 4.3). Do celkových 10 ml bylo rozpuštěno 5 g globulí v 0,1 M HCl. Naměřená absorbance přibližně úměrně odpovídala zvýšení koncentrace analytu v roztoku.

Tab. 4.3 Srovnávací měření přípravku 3C

Hmotnost globulí (g)	A	c v 1 g (ppb)
3	0,013	1,6
5	0,018	1,4

4.4.3 Výhled do budoucna

Námětem k dalšímu studiu těchto přípravků by mohlo být použití citlivější metody pro přesnější stanovení obsahu As. Mez detekce a stanovitelnosti bývá nižší např. u elektrochemického generování hydridů vzhledem k nižší úrovni šumu a omezení rizik kontaminace. Další možností snížení meze detekce je prekoncentrace analytu, například technikou vymrazování nebo in-situ zachytu.

Pro porovnání variability přípravy homeopatik by také mohly být porovnány různé výrobní šarže stejného přípravku.

5 ZÁVĚR

Metodou atomové absorpční spektrometrie s chemickým generováním hydridů byl stanovován obsah toxického As_2O_3 v 10 homeopatických přípravcích Arsenicum Album.

V množství homeopatika jedné denní dávky byl obsah As_2O_3 ve všech zkoumaných léčivech naprosto zanedbatelný vzhledem k referenční dávce. U nejkonzentrovanejšího přípravku dosahovalo množství As_2O_3 hodnot v řádu pouhých desetin promile referenční dávky a tisícín promile nejnižší dávky s pozorovaným účinkem pro průměrného dospělého člověka.

Právě jen u tohoto přípravku (Arsenicum Album 3C, Peithner) byl obsah As stanovitelný použitou technikou. Koncentrace As v ostatních vzorcích byla nižší než mez detekce a stanovitelnosti metody.

Užívání homeopatika Arsenicum Album s sebou tedy nenese žádná rizika, škodlivý účinek z nadměrného příjmu As by se dostavil až po konzumaci přibližně 92 kg přípravku nejnižší potence (nejvyšší koncentrace As_2O_3), což je prakticky zcela nemožné.

Použitá literatura

1. Chakraborti D.: Arsenic Toxicity from Homeopathic Treatment. *Clinical Toxicology*. 2003, 41, str. 963-967.
2. Kitkbright G. F., Sargent M.: *Atomic Absorption and Fluorescence Spectroscopy*. London: Academic Press inc., 1974. 0-12-409750-2.
3. Němcová I., Čermáková L., Rychlovský P.: *Spektrometrické analytické metody I*. Praha: Karolinum, 2004. 80-246-0776-X
4. Červený V., Rychlovský P., Šíma J., Hraníček J.: Elektrochemické generování těkavých sloučenin pro potřeby spektrálních analytických metod. *Chemické listy*. 2009, 103, str. 652-660.
5. Šíma J.: Elektrochemické generování těkavých sloučenin v metodě atomové absorpční spektrometrie. *Doktorská disertační práce*. Praha, 2002.
6. Greenwood N. N., Earnshaw A.: *Chemie prvků*. Praha: Informatorium, 1993. 80-85427-38-9.
7. Arsen a jeho sloučeniny. *Integrovaný registr znečišťování MŽP ČR*. [Online] [Citace: 10. duben 2010.] http://www.irz.cz/repository/latky/arsen_a_jeho_slouceniny.pdf.
8. Tichý M.: *Toxikologie pro chemiky*. Praha: Karolinum, 2003. 80-246-0566-X.
9. Pechová A., Vávrová J. Arsen.: *Datový standard MZ ČR*. [Online] [Citace: 10. duben 2010 .] <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200610/hypertext/AJCDH.htm>.
10. Toxikologické vlastnosti arsenu. *EUROCHEM*. [Online] EuroChem Group Portals. [Citace: 20. duben 2010.] <http://www.eurochem.cz/polavolt/anorg/systemat/as/toxikol.htm>.
11. Jouanny J.: *Materia Medica Homeopathica*. Praha: Vodnář, 1992. 80-85255-21-9.
12. Arsenic, inorganic. *Integrated Risk Information System*. [Online] [Citace: 22. květen 2010.] <http://www.epa.gov/iris/subst/0278.htm>.
13. Cílek V.: Arsen v podzemních vodách Bangladéše. *Vesmír*. 11 1998, 77.
14. Sheikh A. A.: Sociocultural aspects of arsenicosis in Bangladesh. *Journal of Environmental Science and Health*. 2007, 42, str. 1945-1958.

15. Belon P.: Can administration of potentized homeopathic remedy, *Ars. Alb.*, alter ANA titer in people living in high-risk arsenic contaminated areas? *eCAM*. 2006, str. 99-107.
16. Christian G. D., Feldman F. J.: *Atomic Absorption Spectroscopy, Applications in Agriculture, Biology, and Medicine*. New York: Wiley-Interscience, 1970.
17. Khuda-Bukhsh, Anisur R.: Towards understanding molecular mechanisms of action of homeopathic drugs. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2003, str. 339-345.
18. Inglis B., West R.: *Průvodce alternativní medicínou*. Praha: Zemědělské nakladatelství Brázda, 1992. 80-209-0221-x.
19. Homeopatie. *Boiron*. [Online] Boiron CZ. [Citace: 20. duben 2010.] <http://www.boiron.cz/cs/17-co-je-to-homeopatie>.
20. Zákon o léčivech. *Portál veřejné správy ČR*. [Online] Ministerstvo vnitra ČR. [Citace: 20. duben 2010.] http://portal.gov.cz/wps/portal/_s.155/701/.cmd/ad/.c/313/.ce/10821/.p/8411/_s.155/701?PC_8411_name=zákon%20o%20léčivech&PC_8411_l=378/2007&PC_8411_ps=10#10821.
21. Johnson T.: Where does homeopathy fit in pharmacy practice. *Americal Journal of Pharmaceutical Education*. 2007, 71.
22. Dooley T. R.: *Homeopatie; překonáváme medicínu ploché země*. Praha : Alternativa, 2007. 978-80-86936-06-2.
23. Lira-Salazar.: Effects of homeopathic medications on parasitemia of Plasmodium berhhei-infected mice. *Homeopathy*. 2006, 95, str. 223-228.
24. Nash E. B.: *Nejužitečnější léky a symptomy homeopatické materie mediky*. Praha : Alternativa, 2007.
25. D'Ulivo A., Mester Z., Meija J., Sturgeon R. E.: Mechanism of Generation of Volatile Hydrides of Trace Elements by Aqueous Tetrahydroborate(III). Mass Spectrometric Studies on Reaction Products and Intermediates. *Analytical Chemistry*. 2007, 79, str. 3008-3015.